

渡邊 直樹

京都大学大学院生命科学研究所 / 京都大学医学研究所
教授

多重高密度超解像顕微鏡 IRIS による多分子複合体マッピング

§ 1. 研究成果の概要

多くの生命現象は、細胞や組織の形態変化を伴う。それは生体分子の複合体形成や超分子構造の組換えにより実現する。本研究グループは、高密度標識による精細画像と無制限の多重染色を実現した超解像蛍光顕微鏡法 IRIS の開発に成功した (Kiuchi et al. Nature Methods 12: 743–746, 2015)。これは、「超解像ジレンマ」と呼ばれる、既存の超解像顕微鏡が原理的に抱える問題～「斑な」標識による画像劣化を根本的に克服する技術である。IRIS 法では、迅速に結合解離を繰り返す蛍光プローブを高感度顕微鏡で 1 分子可視化しつつ、標的タンパク質の位置を検出する、新しい分子ローカリゼーション法を用いる。IRIS 法では、蛍光プローブの量と種類を無尽蔵に利用できるため、緻密で忠実度の高い画像が得られる。さらにプローブを順次異なるプローブに交換することで、原理的に無制限の種類のタンパク質を同一標本内で観察できる (図)。

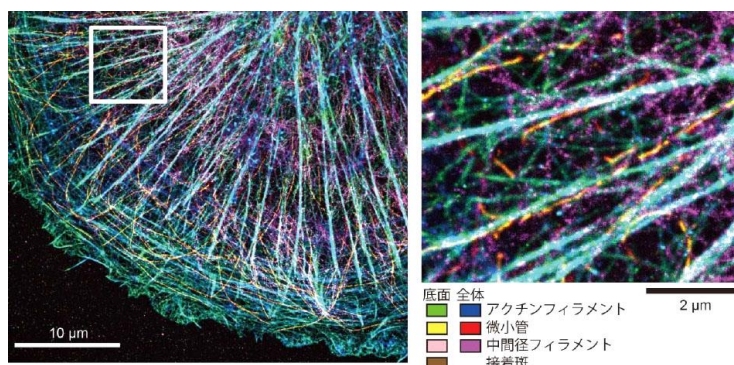


図. 各細胞構造を連続的に染めあげる高精細な画像と多数の観察対象の同一標本内での可視化を実現する IRIS 超解像の例. 固定された培養細胞内の 4 種類の細胞骨格が異なる Z 平面で可視化されている.

本研究では、IRIS 法を広く組織解析や病理診断に応用できる技術とすることを目標に、①多種の分子に対する IRIS 用プローブライブラリーの構築、②IRIS に最適化された自動蛍光顕微鏡の開発、③病理組織標本の三次元 IRIS イメージングの実現へ向けた改良を進めてきた。①について

ては、抗体をベースとした任意の観察対象に対する IRIS プローブの基本作製法を樹立した。しかし、対象によっては、最適プローブの同定・精製に時間がかかる場合があることが判明したため、より迅速にプローブの評価を進めるための、複数のバイオテクノロジー技術をプローブ作製・改良工程に採り入れた。いくつかのパイロット実験から、IRIS プローブをより効率よく同定・改良する戦略がいくつかみつかり、さらなるスクリーニングを敢行するとともに、既存の検査抗体・抗体医薬の開発との組合せたプローブライブラリー構築の可能性も含めた検討を進めている。②③については、三次元分子ローカリゼーション法に適した操作がシンプルな照明系をいくつか試行した。また、球面収差の補正とZ軸方向の分子位置測定が可能な補償光学系の最適化を行った。これらによって、特定の条件で細胞内部の三次元超解像画像が取得可能となった。しかしながら、多くの平面や立体培養・組織切片を三次元観察する際には、標本調整法の最適化や顕微鏡照明およびプローブ性能のさらなる向上、撮影の半自動化等が望まれる。これらの改良をさらに押し進め、個体由来の組織切片においても細胞間の相互位置を保ったまま、多種分子の局在を立体的に捉える超解像顕微鏡の実現を目指している。

【代表的な原著論文】

1. Hiroaki Mizuno., Kotaro Tanaka, Sawako Yamashiro, Akihiro Narita and Naoki Watanabe, “Helical rotation of the diaphanous-related formin mDia1 generates actin filaments resistant to cofilin”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 115, pp. E5000–E5007, 2018
2. Sawako Yamashiro, Soichiro Tanaka, Laura M. McMillen, Daisuke Taniguchi, Dimitrios Vavylonis and Naoki Watanabe, “Myosin-dependent actin stabilization as revealed by single-molecule imaging of actin turnover”, Mol. Biol. Cell, vol. 29, pp.1941–1947, 2018
3. Sawako Yamashiro, Daisuke Taniguchi, Soichiro Tanaka, Tai Kiuchi, Dimitrios Vavylonis and Naoki Watanabe, “Convection-induced biased distribution of actin probes in live cells”, Biophys. J., vol. 116, pp. 142–150, 2019

§ 2. 研究実施体制

① 研究代表者: 渡邊 直樹 (京都大学大学院生命科学研究科・教授)

(グループ内の主な共同研究者 京都大学大学院医学研究科・准教授 木内 泰)

② 研究項目

既存の超解像顕微鏡の限界を超えた無制限の多重染色と高密度標識による高精細画像を実現する超解像蛍光顕微鏡法 IRIS を発展させ、広く生命科学研究、病理診断への応用を目指す。

- ・多色超解像顕微鏡 IRIS 用プローブ迅速作製法開発改良と IRIS プローブの順次作製
- ・標的を標識するための IRIS タグとそのプローブの開発、および生体構造改変解析への応用
- ・3D 化と自動化に向けた組織切片作製法と顕微鏡光学系の改良
- ・IRIS 法の原理を応用した網羅的遺伝子発現解析法開発